

Protocole générique de surveillance des populations pour *Haemophilus influenzae* type b

Préparé par Orin S. Levine, PhD, Anne Schuchat, MD,
Benjamin Schwartz, MD, Jay D. Wenger, MD, et John Elliott, PhD,
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta,
Etats-Unis d'Amérique



PROGRAMME MONDIAL DES VACCINS ET VACCINATIONS
RECHERCHE-DEVELOPPEMENT EN MATIERE DE VACCINS



Organisation mondiale de la Santé
Genève
1998

**Le Programme mondial des Vaccins et Vaccinations
remercie les donateurs dont l'appui financier à l'objet non désigné en 1997
a rendu possible la production du présent document.**

*Numéro de référence pour les commandes : WHO/VRD/GEN/95.05
Imprimé en septembre 1998
(Version anglaise imprimée en novembre 1995; janvier 1997)*

Catalogue disponible sur Internet :
<http://www.who.ch/programmes/gpv/gEnglish/avail/gpvcatalog/catlog1.htm>

Pour commander des exemplaires, s'adresser à :
Organisation mondiale de la Santé
Programme mondial des Vaccins et Vaccinations
Recherche-Développement en matière de Vaccins
CH-1211 Genève 27, Suisse
Télécopie : +41 22 791 41 93/791 41 92 • E-mail : gpv@who.ch

© Organisation mondiale de la Santé 1998

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation. S'il peut être commenté, résumé ou cité sans aucune restriction, il ne saurait cependant être reproduit ni partiellement ou en totalité, pour la vente ou à des fins commerciales.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

Table des matières

Préface	1
1. Introduction	2
1.1 Sérotypes de <i>Haemophilus influenzae</i>	2
1.2 Etudes des pathologies à Hib dans les pays industrialisés	3
1.3 Etudes des pathologies à Hib dans les pays en développement	3
1.4 Pathologies graves à Hib	4
1.5 Raison de l'importance d'un protocole générique pour la méningite à Hib	5
2. Choix de la population à surveiller	7
2.1 Taille de la population à surveiller	7
2.2 Utilisation des services de santé	7
3. Surveillance de la méningite bactérienne chez l'enfant de moins de 5 ans. ..	8
3.1 Définitions du cas	8
3.2 Système de surveillance	8
3.3 Rôle du coordinateur de surveillance	10
4. Techniques de laboratoire	11
4.1 Culture du LCR	11
4.2 Examen du LCR par agglutination sur particules de latex	11
4.3 Hémoculture	12
4.4 Sérotypage des isoléments de <i>H. influenzae</i>	12
4.5 Antibiogramme	12
4.6 Conservation des isoléments de <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> et <i>S. pneumoniae</i> obtenus à partir des prélèvements de LCR	13
4.7 Moyens de laboratoire	13
4.8 Choix et contrôle de qualité des laboratoires	13
5. Analyse périodique des données et contrôle de qualité du système de surveillance	14
5.1 Analyse des données	14
5.2 Indicateurs de qualité à surveiller	14
6. Importance des pathologies graves à Hib	15
7. Bibliographie	17

Annexe 1 : Modèle de registre des prélèvements de LCR	20
Annexe 2 : Formulaire de déclaration de la méningite bactérienne	21
Annexe 3 : Méthodes microbiologiques d'identification de <i>H. influenzae</i> dans le liquide céphalorachidien	22
Annexe 4 : Méthode d'estimation de l'importance locale des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses	26

Préface

Le Programme Mondial des Vaccins et Vaccinations (GPV) de l'OMS s'intéresse depuis longtemps aux vaccins dirigés contre *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Le Programme Elargi de Vaccination (PEV : l'une des unités du GPV) a réexaminé en 1988 et de nouveau en 1992, conjointement avec le Programme de Lutte contre les Infections Respiratoires Aiguës (IRA) de l'OMS, les données dont on dispose sur Hib. Des études plus approfondies concernant les calendriers de vaccination avec le vaccin Hib et l'efficacité de ce vaccin dans les pays en développement ont été encouragées. Un document préparé par le Dr P. Wright pour le PEV dresse les grandes lignes des études qui seraient utiles dans la lutte contre les divers types de méningite, notamment à Hib, dans les pays en développement. Il souligne que la mortalité par méningite semble beaucoup plus élevée dans les pays en développement que dans les pays industrialisés et qu'il faut donc considérer la méningite comme l'un des objectifs lors de l'évaluation des nouveaux vaccins.¹

Depuis novembre 1995, plusieurs études sur le vaccin Hib financées par l'OMS sont en cours dans des pays en développement. En Gambie, un vaste essai sur le terrain des vaccins Hib, parrainé par l'OMS/IRA, devrait bientôt s'achever. Au Niger, une étude sur le terrain, parrainée par l'OMS/GPV, examine différents calendriers vaccinaux pour le vaccin Hib administré simultanément avec d'autres vaccins du PEV.

Le Comité d'Organisation des Etudes Epidémiologiques et de la Recherche sur le Terrain du GPV a fait remarquer la nécessité de mettre au point une méthode pratique qui permette aux responsables des programmes de vaccination d'évaluer l'importance locale des pathologies graves imputables à Hib. C'est à la demande du Comité d'Organisation que ce protocole générique a été préparé par le personnel des instituts suivants : Child & Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial & Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention d'Atlanta (Etats-Unis d'Amérique).

Ce protocole générique est disponible gratuitement auprès de l'OMS/GPV. En retour, le Programme souhaiterait être informé des études qui ont été réalisées avec ce protocole. Le protocole générique peut être adapté librement, mais toute publication réalisée grâce à lui doit le mentionner dans sa bibliographie en tant que document de l'OMS. Les commentaires et les suggestions visant à améliorer ce protocole sont les bienvenus, et pourront être adressés à : l'Unité de Recherche et Développement en matière de Vaccins, Programme Mondial des Vaccins et Vaccinations, OMS, 1211 Genève 27 (Suisse).

¹ Wright PF. Approaches to prevent acute bacterial meningitis in developing countries. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1989, 5 : 479-486.

1. Introduction

On assiste à une rapide disparition des pathologies graves à *Haemophilus influenzae* type b (Hib) dans de nombreux pays industrialisés où les nourrissons sont habituellement vaccinés au moyen des vaccins conjugués Hib [1-4]. Les facteurs déterminants pour l'acceptation de ces vaccins étaient entre autres: i) la possibilité d'administrer les vaccins conjugués Hib en même temps que les autres vaccinations systématiques, et de préférence dans la même seringue; ii) la mise en évidence que les avantages de la vaccination l'emportent largement sur le coût de l'introduction du vaccin conjugué Hib dans un programme de vaccination.

Malgré le succès des vaccins conjugués Hib dans les pays industrialisés, ils n'ont pas encore été introduits dans les calendriers de vaccination systématique des pays en développement. L'utilisation de ces vaccins dans les pays en développement a été limitée, en partie, à cause du manque de données sur l'importance locale des pathologies graves à Hib pour évaluer l'impact possible de l'introduction de ces vaccins dans les programmes de vaccination systématique de l'enfant [5].

Ce protocole générique a pour but de décrire une méthode de surveillance permettant d'estimer l'importance locale des pathologies à Hib et par conséquent d'aider les responsables des programmes de vaccination qui envisagent l'introduction du vaccin conjugué Hib dans leurs programmes. En outre, si ce vaccin fait partie intégrante du programme de vaccination infantile systématique, les données ainsi obtenues fourniront une base de comparaison permettant de mettre en évidence l'impact de la vaccination.

1.1 Sérotypes de *Haemophilus influenzae*

Si d'autres sérotypes de *H. influenzae* et des souches de *H. influenzae* non typables (non capsulées) sont bien à l'origine d'un certain nombre de maladies, le type b est lui, responsable de la majorité des infections graves à *H. influenzae* chez l'enfant de moins de 5 ans. Presque toutes les études de population montrent que plus de 97 % de l'ensemble des méningites à *H. influenzae* sont imputables à Hib [6,7]. Deux exceptions se rapportent à des observations en Papouasie-Nouvelle-Guinée [8] et chez les Apaches de White Mountain [9], où 78-82 % des méningites à *H. influenzae* étaient dues au Hib. Les autres sérotypes de *H. influenzae* et certaines souches de *H. influenzae* non typables pourraient être responsables de la majorité des pneumopathies à *H. influenzae* non bactériémiques de l'enfant de moins de 5 ans; Hib est toutefois responsable de 60-80 % des pneumopathies bactériémiques à *H. influenzae* dans cette classe d'âge [6]. Il est important de noter que les vaccins

conjugués actuels confèrent une protection uniquement contre Hib [3]. C'est pourquoi une surveillance centrée sur les pathologies dues aux infections à *H. influenzae* sérotype b devrait permettre d'identifier les cas de maladies graves potentiellement évitables.

1.2 Etudes des pathologies à Hib dans les pays industrialisés

Dans les pays industrialisés, la plupart des études sur les pathologies à Hib se sont intéressées aux infections invasives, parmi lesquelles méningite, septicémie, pneumopathie bactériémique et divers syndromes (épiglottite, par exemple) accompagnés de la présence du germe dans une localisation normalement stérile (sang, liquide céphalorachidien (LCR), liquide pleural, liquide articulaire, etc.). Les études de population ont donné des estimations précises de l'importance des infections invasives à Hib dans plusieurs pays industrialisés [10-11, 13-14].

Tableau 1. Incidence annuelle déclarée de la méningite à Hib et de l'ensemble des pathologies invasives à Hib chez l'enfant de moins de 5 ans, dans les pays industrialisés, avant l'utilisation massive des vaccins conjugués Hib (d'après certaines études).

Pays	Années	Référence bibliographique	Incidence annuelle pour 100 000 enfants < 5 ans	
			Méningite à Hib	Ensemble des pathologies invasives à Hib
Australie	1985-1987	[10]	25	39-59
Etats-Unis d'Amérique	1959-1984	[13]	40-69	67-130
Finlande	1985-1986	[11]	26	52
Pays de Galles	1989-1990	[14]	22-30	35-44

Ces études sont à l'origine de l'utilisation massive des vaccins conjugués Hib dans les pays industrialisés, où le coût des soins en cas d'infection invasive et celui des séquelles est considérable [15-17, 19-20].

1.3 Etudes des pathologies à Hib dans les pays en développement

Pour les pays en développement et certaines régions moins développées des pays industrialisés, les estimations de l'incidence de la méningite à Hib et des pathologies invasives à Hib dans la population sont limitées [9, 10, 12, 21-26] (Tableau 2), et par conséquent, les analyses coût/avantages et coût/efficacité sont encore moins nombreuses [18, 27, 28]. Il faut réaliser la surveillance dans une population définie et de taille connue pour pouvoir calculer les taux d'incidence. Bien qu'il existe de nombreuses informations concernant la proportion de méningites en fonction de leur étiologie bactérienne, ces données proviennent typiquement de l'évaluation de patients dans un même hôpital ou centre de soins. Dans la mesure où la population qui s'adresse à un centre médical ne peut pas être définie et où les enquêtes hospitalières

sont influencées par les profils du recours aux soins, l'incidence d'une maladie ou l'importance d'une maladie due à un germe donné ne saurait être estimée à partir de ces études.

1.4 Pathologies graves à Hib

Pour caractériser l'importance des pathologies à Hib, il faut prêter une attention particulière à certains facteurs clés. Il est cliniquement impossible de distinguer les syndromes courants provoqués par Hib - méningite, septicémie et pneumopathie - de ces mêmes maladies provoquées par d'autres germes capsulés (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*) ou par un certain nombre d'autres bactéries ou virus. Par conséquent, pour pouvoir calculer la fréquence d'une maladie due à une bactérie donnée, le germe doit être identifié au laboratoire à partir des prélèvements cliniques. Comme plus de 80% de l'ensemble des maladies graves dues à Hib surviennent chez l'enfant de moins de 5 ans, la surveillance s'intéresse plus particulièrement à cette classe d'âge.

Tableau 2. Incidence déclarée de la méningite à Hib et de l'ensemble des pathologies invasives à Hib chez l'enfant de moins de 5 ans, dans les pays en développement et certains territoires en développement des pays industrialisés (d'après certaines études).

Territoires	Années	Référence bibliographique	Incidence annuelle pour 100 000 enfants < 5 ans	
			Méningite à Hib	Ensemble des pathologies invasives à Hib
Afrique du Sud	1991-1992	[25]	34	47
Australie/Aborigènes	1985-1987	[10]	153	450
Chili	1985-1987	[21]	15-25	22-43
Etats-Unis d'Amérique/ Apaches	1973-1980	[26]	254	NA
Etats-Unis d'Amérique/ Navajos	1974-1980	[9]	152	NA
Gambie	1985-1987	[22]	60	NA
Israël	1988-1990	[12]	18	34
Koweït	1981-1987	[23]	31*	NA
Sénégal	1970-1979	[24]	51	NA

NA = non applicable

* Incidence annuelle pour 100 000 enfants de moins de 2 ans

1.4.1 Méningite à Hib

Si la méningite ne représente qu'une petite partie des pathologies graves à Hib, la surveillance doit néanmoins porter spécialement sur la méningite, car son diagnostic est relativement simple et sa surveillance permet d'obtenir des estimations très précises de l'incidence. On peut identifier les agents bactériens de la méningite par culture des prélèvements de LCR de patients présentant les symptômes cliniques de la méningite. On peut également déceler les germes en recherchant l'antigène bactérien dans le LCR (agglutination sur particules de latex). Comme la plupart des méningites de l'enfant ont une étiologie bactérienne, le rendement des cultures de LCR en cas de méningite est supérieur au rendement des cultures effectuées pour les patients atteints d'autres syndromes tels que septicémie ou pneumopathie.

1.4.2 Septicémie à Hib

L'identification des agents bactériens responsables de septicémies est plus difficile que pour la méningite. Un grand nombre de bactéries et de germes non bactériens (e.g. virus, parasites et mycobactéries) provoquent des accès de fièvre et, par conséquent, une hémoculture systématique chez l'enfant fébrile en vue de la surveillance entraînerait une charge de travail énorme pour le laboratoire et l'obtention d'un petit nombre d'isolements bactériens par rapport au coût du prélèvement et de la culture. Dans de nombreux pays, l'hémoculture n'est donc pas systématiquement pratiquée chez l'enfant fébrile. En outre, l'isolement de Hib à partir d'hémocultures est parfois plus difficile qu'à partir du LCR.

1.4.3 Pneumopathie à Hib

Si, dans de nombreux pays en développement, la plupart des pathologies graves imputables à Hib sont des pneumopathies, l'identification d'un agent étiologique dans les cas de pneumonie est particulièrement difficile. En effet, dans la plupart des études, on observe une bactériémie chez moins de 20 % des enfants souffrant de pneumonie [29]. Il est difficile d'obtenir de bons échantillons de crachat chez le nourrisson et l'enfant, et la culture de crachat a rarement une valeur diagnostique en raison de la pousse d'un grand nombre de germes. On réalise rarement des aspirations bronchiques hors du contexte de la recherche. On ne connaît pas la sensibilité et la spécificité des méthodes sérodiagnostiques pour la pneumopathie à Hib. Ces techniques sont peu utilisées.

1.5 Raison de l'importance d'un protocole générique pour la méningite à Hib

Si le protocole générique s'adresse principalement à la méningite à Hib, c'est parce que parmi les pathologies graves à Hib, c'est celle que la surveillance permet de mesurer le plus facilement. Ce protocole s'appuie sur la surveillance de la méningite bactérienne en population et nécessite :

-
- l'identification d'une population à surveiller bien définie et suffisamment nombreuse ;
 - la participation de tous les centres de soins concernés auxquels s'adresse la population ;
 - l'utilisation en routine des méthodes de diagnostic appropriées dans les hôpitaux et les laboratoires.

La mise en oeuvre de ce protocole générique peut exiger des modifications, en fonction des pratiques diagnostiques et thérapeutiques dans un secteur donné ainsi que des ressources disponibles.

Il est important de ne pas oublier que la méningite à Hib ne représente qu'une fraction de toutes les pathologies dues à Hib. Dans un grand nombre de pays où la mortalité par pneumopathie chez le nourrisson et l'enfant est élevée, la plus grande part des maladies graves à Hib se manifeste sous forme de pneumopathie. On trouvera décrite en annexe 4, une méthode d'estimation de l'importance locale des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses.

2. Choix de la population à surveiller

2.1 Taille de la population à surveiller

Comme la méningite bactérienne est relativement peu fréquente chez l'enfant de moins de 5 ans (peut-être 200 cas par an pour 100 000 enfants de moins de 5 ans), la population surveillée doit être suffisamment nombreuse (250 000-500 000 personnes au total, ou 50 000-100 000 enfants de moins de 5 ans environ) pour que le nombre de cas attendus soit suffisamment grand (200-400 cas) sur une période de deux ans. La population surveillée doit être bien définie géographiquement, et on doit disposer de données démographiques par âge (e.g. population totale, nombre d'enfants nés vivants et nombre d'enfants de 0 à 4 ans) pour pouvoir calculer la fréquence de la maladie par classe d'âge. Il est préférable que la population soit stable (c'est à dire un nombre d'arrivées et de départs limité) car il est difficile d'exercer une surveillance étroite et de calculer des taux dans une population mobile.

Les données sur la mortalité toutes causes confondues chez l'enfant de moins d'un an et celui de moins de cinq ans peuvent être utilisées, si elles sont disponibles, pour estimer l'importance des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses (voir annexe 4).

2.2 Utilisation des services de santé

Les résidents de la population surveillée doivent bénéficier d'un bon accès et utiliser largement un ou plusieurs centres médicaux qui prennent en charge les maladies graves comme la méningite. La qualité des soins dans ces établissements doit être telle, que la ponction lombaire fasse partie des gestes de routine lorsqu'un enfant de la zone surveillée présente des symptômes de méningite. Les populations dans lesquelles on compte un grand nombre de décès infantiles parmi les personnes qui ne s'adressent pas à un centre de soins, sont moins adaptées à la surveillance de la méningite, dans la mesure où la surveillance sous-estimerait la morbidité et la mortalité dues à cette infection. Tous les établissements sanitaires (y compris tous les hôpitaux, publics et privés) qui diagnostiquent et soignent la méningite de l'enfant dans la population surveillée, doivent être inclus dans le système de surveillance. La population la mieux adaptée à la surveillance est probablement une population urbaine, géographiquement distincte des autres populations et desservie par un ou plusieurs centres médicaux importants.

3. Surveillance de la méningite bactérienne chez l'enfant de moins de 5 ans

3.1 Définitions du cas

Pour une surveillance étroite, il faut fixer des définitions du cas de référence et les utiliser dans la totalité du secteur surveillé. Les définitions recommandées du cas probable et du cas confirmé de méningite bactérienne sont données ci-dessous.

Le cas probable de méningite bactérienne correspond à l'enfant de moins de 5 ans présentant des symptômes cliniques de méningite (fièvre, maux de tête, raideur de la nuque, fontanelle bombée ou modifications de l'état mental) avec un LCR trouble ("chargé") ou un LCR présentant un taux de protéines (protéïnorachie) élevé (>100 mg/dl), une diminution du taux de glucose (glycorachie) (<40 mg/dl) ou une leucocytose (>100 globules blancs/mm³) avec plus de 80 % de neutrophiles (parmi lesquels des neutrophiles immatures en groupe).

REMARQUE : La présence de sang dans le LCR risque de compliquer l'interprétation des résultats de la numération cellulaire, des taux de protéines et de glucose. A chaque fois que c'est possible, on utilisera pour les examens chimiques des échantillons non contaminés par du sang. La numération cellulaire, les taux de protéines et de glucose obtenus sur des prélèvements de LCR contenant du sang ne seront pas utilisés pour diagnostiquer un cas probable de méningite bactérienne si le rapport globules rouges/globules blancs est >500:1.

Dans le cadre de la surveillance, le cas confirmé de méningite bactérienne correspond à l'enfant de moins de 5 ans présentant des symptômes cliniques de méningite (fièvre, maux de tête, raideur de la nuque, fontanelle bombée ou modifications de l'état mental) avec identification du germe dans le LCR, par culture ou détection de l'antigène bactérien.

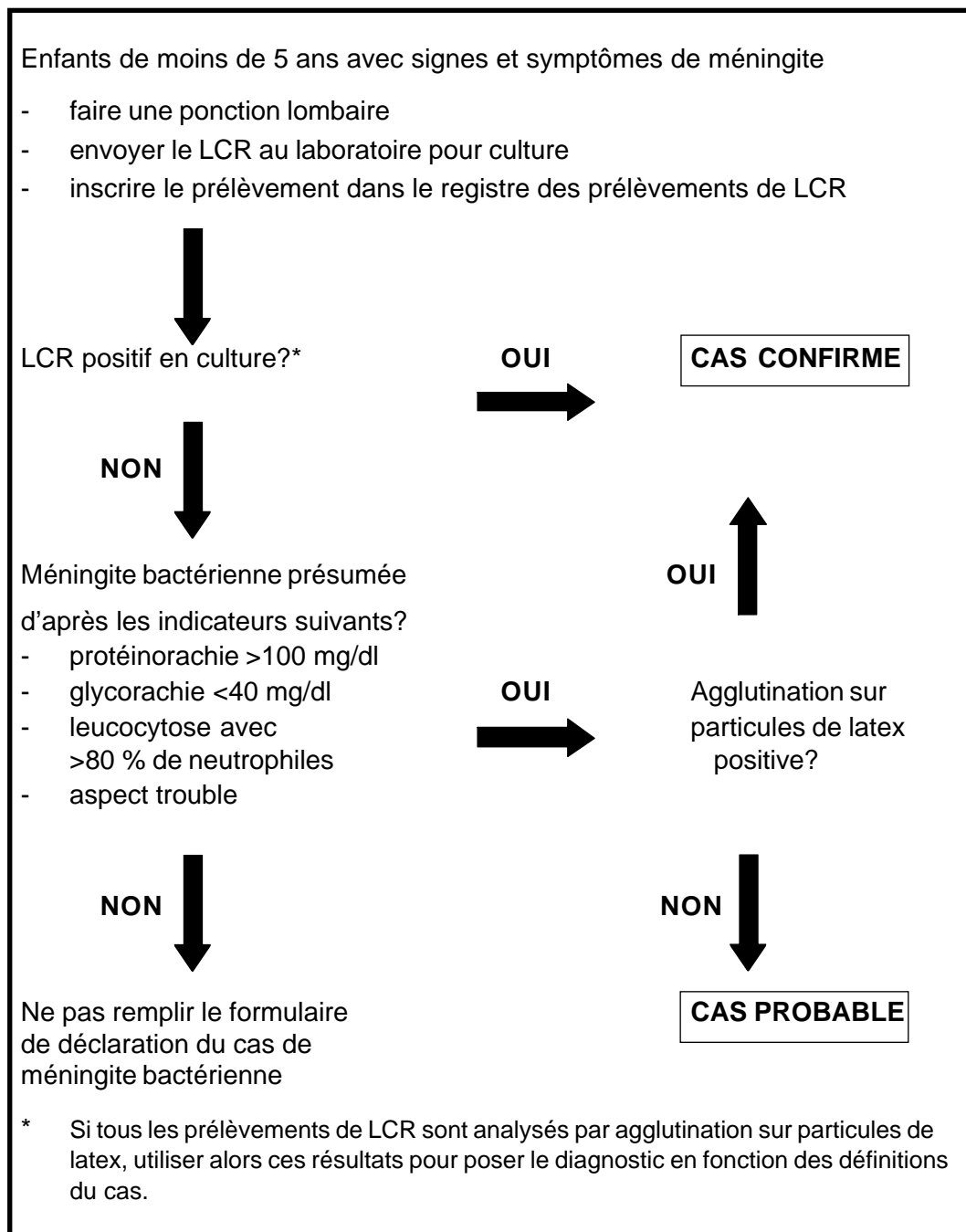
3.2 Système de surveillance

La figure 1 schématise le recueil des données de la surveillance de la méningite bactérienne et leur enregistrement pour chaque cas présumé.

3.2.1 Registre de laboratoire des prélèvements de LCR

Chaque laboratoire doit tenir un registre des prélèvements de LCR où seront notées toutes les informations concernant tous les enfants de moins de 5 ans présumés atteints de méningite (pour lesquels on a pratiqué une ponction lombaire). On trouvera en annexe 1, un modèle de registre adapté à cet usage. Chaque fois qu'un prélèvement de LCR est adressé au laboratoire, il doit être inscrit dans le registre. Une fois obtenus, les résultats des examens de laboratoire (e.g. numération cellulaire, résultats des cultures, etc.), doivent être inscrits dans ce registre.

Figure 1 : Système de surveillance de la méningite bactérienne



3.2.2 Formulaire de déclaration de la méningite bactérienne

Un modèle de formulaire simple de déclaration de la méningite bactérienne figure en annexe 2. Il devra être adapté aux besoins locaux. Pour chaque cas confirmé de méningite bactérienne (soit par culture, soit par agglutination sur particules de latex), il faut remplir un formulaire comportant des données cliniques et démographiques. Lorsque le cas est confirmé par culture, l'isolement doit être conservé en vue de tests ultérieurs (sérotypage et antibiogramme). Devant un cas probable de méningite bactérienne, il faut également remplir le formulaire de déclaration de la méningite bactérienne. Le formulaire de déclaration n'a pas à être rempli pour les autres patients chez lesquels on a fait un prélèvement de LCR.

3.3 Rôle du coordinateur de surveillance

Pour rendre compte de l'importance exacte de la méningite à Hib, aucune donnée de surveillance ne doit manquer concernant les points suivants : identification de l'enfant atteint de méningite, prélèvement des échantillons de LCR pour analyse, identification du Hib par une méthode très sensible à partir de la culture de LCR. Pour atteindre de tels objectifs, il faut une communication régulière entre chacun des sites qui procèdent aux examens et un coordinateur central de la surveillance. Celui-ci devra nommer sur chaque lieu d'examen (laboratoire ou hôpital) une personne chargée d'inscrire les données concernant les échantillons dans le registre des prélèvements de LCR et de remplir les formulaires de déclaration de la méningite bactérienne.

Le coordinateur de la surveillance (ou d'autres membres du projet de surveillance) doit périodiquement se rendre sur les lieux d'examen (toutes les une à quatre semaines) pour recueillir les informations et examiner les registres de laboratoire.

Quand les formulaires de déclaration parviennent au coordinateur de la surveillance, il doit vérifier qu'ils sont complets et exacts. Il aura parfois à rechercher les données manquantes. Les données des formulaires de déclaration seront si possible saisies sur informatique.

4. Techniques de laboratoire

Pour pouvoir évaluer l'importance de la méningite due à Hib (et à d'autres bactéries), il est indispensable que le diagnostic et l'étiologie de la méningite soient déterminés au moyen de techniques sensibles et spécifiques. Tout enfant de moins de 5 ans qui présente des signes et des symptômes de méningite doit subir une ponction lombaire, et le LCR doit être analysé (numération cellulaire [formule comprise], protéinorachie et glycorachie) ou observé macroscopiquement à la recherche d'un trouble. On fera également des colorations de Gram sur des frottis de LCR. Tous les prélèvements de LCR seront mis en culture pour rechercher les germes pathogènes.

4.1 Culture du LCR

Le détail des méthodes est indiqué en annexe 3. En résumé, on réalise l'isolement de *H. influenzae* en réalisant un ensemencement en stries avec le LCR non dilué, sur une gélose chocolat complétée en facteurs X et V, incubée à 35-37°C sous atmosphère contenant 5 à 10 % de CO₂ (incubateur à CO₂ ou cloche à bougie) pendant au moins 4 jours avant de jeter l'échantillon.

On doit impérativement utiliser une gélose chocolat complétée en facteurs X et V. En effet, *H. influenzae* ne pousse pas toujours sur certaines géloses chocolat non complétées en facteurs X et V. On s'est aperçu que certains hôpitaux qui ne signalaient jamais de cas pathologiques à *H. influenzae*, utilisaient des milieux non favorables à la croissance du germe [30]. Après complémentation de leurs milieux en facteurs X et V, les cultures ont été positives pour *H. influenzae*. Pour diminuer la variabilité, on pourra désigner un laboratoire central qui préparera les boîtes de gélose chocolat complétée en facteurs X et V et qui les distribuera aux autres laboratoires d'analyse de la zone de surveillance. On peut aussi se procurer directement chez un fabricant, des boîtes de gélose chocolat complétée en facteurs X et V prêtes à l'emploi.

4.2 Examen du LCR par agglutination sur particules de latex

L'agglutination sur particules de latex facilite le diagnostic de la méningite bactérienne mais c'est un test coûteux (jusqu'à 5\$ US par test) et l'interprétation des résultats peut être difficile pour un technicien inexpérimenté [31]. Dans les régions où tous les prélèvements de LCR sont analysés par agglutination sur particules de latex, on utilisera ces résultats pour poser le diagnostic de méningite bactérienne confirmée. Toutefois, lorsque l'agglutination sur particules de latex n'est pas systématiquement pratiquée sur tous les prélèvements de LCR, il est probablement plus rentable de limiter le nombre de prélèvements qui doivent être testés par cette méthode. Pour chaque prélèvement, on congèlera un échantillon d'1 ml de LCR. Si la culture reste

négative après 4 jours d'incubation, cet échantillon congelé sera envoyé à un laboratoire central qui pratiquera ultérieurement une agglutination sur particules de latex. On diminue les coûts et on réduit la variabilité des résultats si c'est le même laboratoire qui conserve et qui analyse les prélèvements. La rentabilité peut encore être améliorée en limitant l'examen par agglutination sur particules de latex aux prélèvements venant de cas probables de méningite bactérienne (c'est-à-dire LCR purulent, protéinorachie élevée, glycorachie diminuée ou hyperleucocytose avec >80 % de neutrophiles).

4.3 Hémoculture

Si les vaccins contre le Hib étaient introduits en routine dans les programmes de vaccination, il serait particulièrement utile d'avoir des informations sur les pathologies bactériémiques à Hib pour pouvoir surveiller les conséquences de la vaccination au cours du temps. Ainsi, si l'on pratique systématiquement des hémocultures chez l'enfant de moins de 5 ans ayant eu un diagnostic de septicémie présumée au centre médical dans le cadre de la surveillance, ces données peuvent compléter celles dont on dispose sur la méningite. Toutefois, pour les hémocultures, on ne pratiquera pas en routine le test d'agglutination sur particules de latex en raison essentiellement de son coût et du mauvais rendement de la méthode. En outre, quand les hémocultures ne sont pas systématiquement pratiquées chez l'enfant de moins de 5 ans présumé avoir une septicémie, nous recommandons que les efforts de surveillance soient tous consacrés à l'identification et au diagnostic en laboratoire de la méningite bactérienne, et non à l'amélioration de la surveillance des pathologies bactériémiques à Hib.

4.4 Sérotypage des isollements de *H. influenzae*

Tous les isollements de *H. influenzae* recueillis dans le LCR ou le sang (ou tout autre liquide biologique normalement stérile) doivent être systématiquement adressés à un laboratoire central qui assurera le sérotypage, si celui-ci n'est pas pratiqué à l'hôpital déclarant. Les coordinateurs responsables de la surveillance envisageront peut-être d'organiser le sérogroupage de *N. meningitidis* et le sérotypage de *S. pneumoniae* sur ces isollements.

4.5 Antibiogramme

Dans certaines zones sous surveillance, on voudra peut-être déterminer les profils de sensibilité aux antibiotiques des isollements de *H. influenzae* et *S. pneumoniae*. Dans la mesure où l'antibiorésistance peut diminuer la réaction du patient au traitement, il est parfois utile pour le clinicien de disposer d'informations sur la fréquence des germes antibiorésistants. Il est toutefois difficile de normaliser les opérations au laboratoire pour obtenir des antibiogrammes standardisés. Pour garantir la qualité des antibiogrammes, les isollements recueillis dans les secteurs surveillés seront testés dans un laboratoire de référence ayant une expérience reconnue en la matière.

4.6 Conservation des isoléments de *H. influenzae*, *N. meningitidis* et *S. pneumoniae* obtenus à partir des prélèvements de LCR

Les isoléments obtenus à partir du LCR dans certaines zone sous surveillance, pourront être conservés en vue d'études ultérieures. On pourra par exemple sur des isoléments de *H. influenzae*, *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae* recueillis à partir des prélèvements de LCR, pratiquer les études suivantes : parenté génétique des souches, prévalence de l'antibiorésistance et relation entre facteurs de virulence et issue de la maladie. Pour plus de détails sur la conservation et le transport des isoléments, se reporter à l'annexe 3.

4.7 Moyens de laboratoire

En fonction de l'incidence globale attendue de la méningite bactérienne chez l'enfant de moins de 5 ans et de la proportion de l'ensemble des cultures de LCR positives pour Hib, on peut estimer les moyens de laboratoire nécessaires pour réaliser la surveillance de cette forme de méningite. En supposant que l'incidence globale de la méningite bactérienne chez l'enfant de moins de 5 ans (en l'absence d'épidémie à méningocoque) est d'environ 200 cas pour 100 000 par an, et que le germe est isolé dans 20 à 25 % de toutes les cultures de LCR réalisées chez des patients présumés atteints de méningite, on estime que les centres de soins et les laboratoires doivent s'attendre à traiter 800-1000 prélèvements de LCR pour 100 000 enfants de moins de 5 ans présents dans la population surveillée. Ainsi, pour une population surveillée de 1 million d'habitants, dans laquelle le nombre d'enfants de moins de 5 ans atteint 200 000 (en supposant que 20 % de la population a moins de 5 ans), les laboratoires de la zone de surveillance peuvent prévoir environ 1600-2000 prélèvements de LCR par an dans le cadre de la surveillance de la méningite bactérienne. Concernant la surveillance de la bactériémie, le nombre estimé d'hémocultures doit être environ cinq fois plus grand que le nombre de cultures de LCR à la recherche d'une méningite bactérienne.

4.8 Choix et contrôle de qualité des laboratoires

L'évaluation des techniques de laboratoire, l'amélioration et la standardisation de ces pratiques et l'évaluation périodique de leurs capacités sont trois éléments capitaux de la surveillance. Une fois les centres participants identifiés, on procédera à plusieurs contrôles de qualité des laboratoires, et notamment l'aptitude du laboratoire à cultiver Hib et à entretenir des cultures viables, ainsi que l'aptitude du personnel à utiliser et à interpréter les tests d'agglutination.

5. Analyse périodique des données et contrôle de qualité du système de surveillance

5.1 Analyse des données

Les données obtenues dans le cadre de la surveillance doivent être analysées périodiquement pour pouvoir fournir aux centres déclarants des informations rétroactives sur leur activité, pour identifier les problèmes éventuels de la surveillance et apporter une information aux décideurs et aux médecins. Des paramètres simples comme le taux d'incidence global et par âge doivent être calculés périodiquement. Les mises à jour de la surveillance seront, si possible, communiquées au moyen des bulletins d'information ou des bulletins ministériels existants.

5.2 Indicateurs de qualité à surveiller

Un réexamen périodique des informations permet parfois de repérer les secteurs ayant des problèmes pour assurer la surveillance. On trouvera ci-dessous une liste de quelques indicateurs signalant l'existence d'un problème dans le déroulement de la surveillance et indiquant où le rechercher.

- **Si moins de 10 % des prélèvements de LCR donnent lieu à l'isolement d'un germe**, contrôler : 1) l'aptitude de tous les laboratoires à identifier *H. influenzae* et d'autres espèces bactériennes dans des cultures inoculées avec ce germe (témoins positifs) ; 2) les critères de prélèvement du LCR (vérifier que seuls les patients ayant des signes et des symptômes de méningite ont une ponction lombaire) ; 3) la prise d'antibiotiques avant admission ; et, 4) la présence éventuelle d'épidémies d'autres maladies non bactériennes (dengue, paludisme, leptospirose) susceptibles d'entraîner une augmentation du nombre des ponctions lombaires.
- **Si moins de 25 % des cas de méningite bactérienne confirmés sont dus à *H. influenzae***, examiner : 1) l'aptitude de tous les laboratoires à identifier *H. influenzae* et d'autres espèces bactériennes ; et, 2) l'existence éventuelle d'une épidémie d'infection méningococcique ou de tuberculose.

6. Importance des pathologies graves à Hib

On classe généralement les pathologies graves à Hib en trois catégories cliniques : i) méningite, ii) autres affections invasives (e.g. arthrite septique, ethmoïdite, épiglottite, etc.), et iii) pneumopathies (bactériémiques et non bactériémiques).

Le protocole générique pour la surveillance de la méningite bactérienne, qui est décrit dans le présent document, ne prend en compte qu'une partie des infections graves à Hib dans une population. La méningite est la plus grave d'entre elles, avec un taux de létalité de 3-40 % [6]. Elle laisse chez 10-40 % des survivants des séquelles graves et incapacitantes [32]. Mais, surtout, la méningite est le type de pathologie grave à Hib dont l'estimation par les données de surveillance est la plus fiable (Tableau 3).

Les autres syndromes invasifs à Hib sont généralement moins graves (taux de létalité 1-5 %) et laissent rarement des séquelles. Plusieurs études ont montré que les vaccins conjugués Hib empêchent très efficacement la survenue de la méningite et des syndromes bactériémiques (>90 %) [33-35].

Lors des études de population réalisées dans les pays industrialisés, la méningite représente en général 50-60 % de l'ensemble des pathologies invasives à Hib (à l'exclusion de la pneumopathie avec bactériémie) [6]. Les pathologies invasives à Hib restantes, soit 40-50 %, sont un mélange de bactériémies sans foyer, d'arthrites septiques, de péritonites, d'ethmoïdites, d'épiglottites et d'autres infections localisées.

La pneumopathie due à Hib est moins grave que la méningite (taux de létalité 2-10 %), mais elle entraîne parfois des séquelles de longue durée chez les survivants (1%) [36]. Toutefois, la détermination de l'incidence des pneumopathies à Hib par la surveillance systématique n'étant pas possible, leur importance est estimée par extrapolation à partir d'autres données (incidence de la méningite à Hib, incidence globale des infections respiratoires basses aiguës). On trouvera en annexe 4, une méthode permettant d'estimer l'importance des pneumopathies à Hib. L'efficacité des vaccins conjugués Hib contre la pneumopathie bactériémique est élevée (80 %) [37] ; leur efficacité contre la pneumopathie non bactériémique n'a pas encore été mesurée par des essais vaccinaux.

S'il est impossible d'extrapoler directement les données sur la fréquence de la méningite à Hib ou la proportion de méningites bactériennes dues au Hib, pour estimer la proportion d'infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses, l'isolement du germe chez le patient atteint de méningite atteste la présence de pathologies graves à Hib dans la population. En Gambie et en Papouasie-Nouvelle-Guinée, deux pays en développement où ont été étudiés les agents étiologiques de la méningite et de la

pneumopathie, la proportion de méningites bactériennes imputables au Hib était respectivement de 40 % et 49 %, et la proportion de pneumopathies bactériémiques dues au même germe était respectivement de 15 % et 44 % [8, 38, 39]. Ainsi, si l'on ne dispose pas de données indiquant que la proportion de méningites dues au Hib est directement liée à la proportion de pneumopathies dues au même germe, ces informations attestent de leur présence et montrent que le spectre des pathologies graves à Hib comprend très probablement la pneumopathie.

Tableau 3. Caractéristiques des trois grands syndromes cliniques dus à *Haemophilus influenzae* type b

	Syndrome clinique à <i>Haemophilus influenzae</i> type b		
	Méningite	Autres pathologies invasives	Pneumopathie
Exactitude des estimations à partir de la surveillance	Très bonne	Moyenne/bonne	Difficilement estimée par la surveillance systématique
Taux de létalité	3-40 %	1-5 %	2-10 %
Fréquence des incapacités de longue durée après guérison	10-40 %	—	1 %
Efficacité des vaccins conjugués anti-Hib dans la prévention	>90 %	>90 %	80 %*

* Efficacité de 80 % contre la pneumopathie bactériémique ; efficacité inconnue en cas de pneumopathie non bactériémique.

7. Bibliographie

1. Programme élargi de vaccination. Calendriers de vaccination dans la Région européenne de l'OMS, 1995. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 1995;70:221-228.
2. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA*. 1993;269:221-6.
3. Wenger JD. Impact of *Haemophilus influenzae* type b vaccines on the epidemiology of bacterial meningitis. [Mise au point bibliographique]. *Infectious Agents & Disease*. 1993;2:324-32.
4. Takala AK, Peltola H, Eskola J. Disappearance of epiglottitis during large-scale vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine among children in Finland. *Laryngoscope*. 1994;104:731-5.
5. Keusch GT. CGVD workshop: should *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines be introduced into the EPI? *Lancet*. 1992;339:802-3.
6. Funkhouser A, Steinhoff MC, Ward J. *Haemophilus influenzae* disease and immunization in developing countries. *Rev Infect Dis*. 1991;13(Suppl 6):S542-54.
7. Wenger JD, Pierce R, Deaver K, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: a population-based evaluation of the role of capsular polysaccharide serotype. *J Infect Dis*. 1992; 165(Suppl 1):S34-5.
8. Gratten M, Barker J, Shann F et al. The aetiology of purulent meningitis in highland children: a bacteriological study. *P N G Med J*. 1985;28:233-40.
9. Losonsky GA, Santosham M, Sehgal VM, Zwahlen A, Moxon ER. *Haemophilus influenzae* disease in the White Mountain Apaches: molecular epidemiology of a high risk population. *Pediatr Infect Dis J*. 1984;3:539-47.
10. Gilbert GL. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease in Australia and New Zealand. *Vaccine*. 1991;9:S10-3.
11. Takala AK, Eskola J, Peltola H, Makela PH. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland before vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8:297-302.
12. Dagan R. The Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. A two-year prospective, nationwide study to determine the epidemiology and impact of invasive *Haemophilus influenzae* type b infection in Israel. *Clin Infect Dis*. 1992;15:720-5.

-
13. Broome CV. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 1987;6:779-82.
 14. Howard AJ, Dunkin KT, Musser JM, Palmer SR. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease in Wales. *BMJ.* 1991;303:441-5.
 15. Harris A, Hendrie D, Bower C, Payne J, de Klerk N, Stanley F. The burden of *Haemophilus influenzae* type b disease in Australia and an economic appraisal of the vaccine PRP-OMP. *Med J Aust.* 1994;160:483-8.
 16. Trollfors B. Cost-benefit analysis of general vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1994;26:611-4.
 17. Harris A, Hendrie D, Bower C, Payne J, de Klerk N, Stanley F. The burden of *Haemophilus influenzae* type b disease in Australia and an economic appraisal of the vaccine PRP-OMP. *Med J Aust.* 1994;160:483-8.
 18. Ginsberg GM, Kassis I, Dagan R. Cost benefit analysis of *Haemophilus influenzae* type b vaccination programme in Israel. *J Epidemiol Community Health.* 1993;47:485-90.
 19. McIntyre P, Hall J, Leeder S. An economic analysis of alternatives for childhood immunisation against *Haemophilus influenzae* type b disease. *Aust J Public Health.* 1994;18:394-400.
 20. Clements DA, Booy R, Dagan R et al. Comparison of the epidemiology and cost of *Haemophilus influenzae* type b disease in five western countries. *Pediatr Infect Dis J.* 1993;12:362-7.
 21. Ferreccio C, Ortiz E, Astroza L, Rivera C, Clemens J, Levine MM. A population-based retrospective assessment of the disease burden resulting from invasive *Haemophilus influenzae* in infants and young children in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9:488-94.
 22. Bijlmer HA, van Alphen L. A prospective, population-based study of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in The Gambia and the possible consequences. *J Infect Dis.* 1992; 165(Suppl 1):S29-32.
 23. Zaki M, Daoud AS, ElSaleh Q, West PWJ. Childhood bacterial meningitis in Kuwait. *J Trop Med Hyg.* 1990;93:7-11.
 24. Cadoz M, Denis F, Diop Mar I. Etude épidémiologique des cas de méningites purulentes hospitalisés à Dakar pendant la décennie 1970-1979. *Bull WHO.* 1981;59:575-84.
 25. Hussey G, Hitchcock J, Schaaf H et al. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* infections in Cape Town, South Africa. *Ann Trop Paediatr.* 1994;14:97-103.
 26. Coulehan JL, Michaels RH, Hallowell C, Schults R, Welty TK, Kuo JSC. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease among Navajo indians. *Public Health Rep.* 1984;99:404-9.
 27. Levine OS, Ortiz E, Contreras R et al. Cost-benefit analysis for the use of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol.* 1993;137:1221-8.

-
28. Hussey GD, Lasser ML, Reekie WD. The costs and benefits of a vaccination programme for *Haemophilus influenzae* type B disease. *S Afr Med J*. 1995;85:20-5.
 29. Isaacs D. Problems in determining the etiology of community-acquired childhood pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8:143-8.
 30. Gellert GA, Wenger JD, Brilla A. *Haemophilus influenzae* type b disease in Latvia [letter]. *Lancet*. 1994;344:959
 31. Kaplan EL, Reid HFM, Johnson DR, Kunde CA. Rapid antigen detection in the diagnosis of group A streptococcal pyoderma: influence of a "learning curve effect" on sensitivity and specificity. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8:591-3.
 32. Baraff LJ, Lee SI, Schriger DL. Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 1993;12:389-94.
 33. Booy R, Hodgson S, Carpenter L et al. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP- T. *Lancet*. 1994;344:362-6.
 34. Santosham M, Wolff M, Reid R et al. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex. *N Engl J Med*. 1991;324:1767-72.
 35. Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine a United States population of 61,080 children. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10:97-104.
 36. Schwartz B, Gove S, Lipman H, Lob-Levyt G. The etiology of acute lower respiratory tract infections among young children in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. (sous presse)
 37. Lagos R, Horowitz I, Toro J et al. Post-licensure effectiveness and efficacy trial of PRP-T conjugate vaccine in preventing invasive *Haemophilus influenzae* type b infections in Chilean infants. 1994; Abstract G76 : présenté à la 34^e International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Orlando, FL. 4-7 octobre, 1994.
 38. O'Dempsey TJ, McArdle TF, Lloyd-Evans N et al. Importance of enteric bacteria as a cause of pneumonia, meningitis and septicemia among children in a rural community in The Gambia, West Africa. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:122-8.
 39. Barker J, Gratten M, Riley I et al. Pneumonia in children in the eastern highlands of Papua New Guinea: a bacteriologic study of patients selected by standard clinical criteria. *J Infect Dis*. 1989;159:348-52.

Annexe 2 :

Formulaire de déclaration de la méningite bactérienne

Hôpital déclarant : _____ Dossier médical N° : _____			
Patient			
Nom de famille : _____ Prénom : _____			
Adresse : _____ Ville : _____ Quartier : _____			
Résident de la zone de surveillance : Oui/Non Sexe : M/F			
Age (mois) : ____ Date de naissance : ____ / ____ / ____ (jour/mois/année)			
Données cliniques			
Date du prélèvement : ____ / ____ / ____ (jour/mois/année)			
Issue de la maladie à la sortie : Vivant / Mort / Inconnu			
Si vivant : Signes de déficience neurologique, de surdité ou d'autres séquelles à la sortie ? Oui / Non / Inconnu			
Données biologiques			
Aspect du LCR : Clair / Trouble / Hémorragique / Pas de prélèvement			
Numération cellulaire : _____ % de neutrophiles : _____			
Protéïnorachie : _____ (mg/dl) Glycorachie : _____ (mg/dl)			
Coloration de Gram : _____ (PF si la coloration de Gram n'a pas été faite)			
Identification des germes dans le LCR ou le sang :			
Méthode de recherche (cocher à l'endroit correspondant)			
	LCR : culture	LCR : particules de latex	Hémoculture
<i>Haemophilus influenzae</i>	_____	_____	_____
<i>Neisseria meningitidis</i>	_____	_____	_____
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	_____	_____	_____
Autre : _____	_____	_____	_____
Pour <i>H. influenzae</i> , préciser :			
Isolement de sérotype b ? Type b _____ Autre type _____ Pas de sérotypage _____			
Pour <i>N. meningitidis</i> , préciser :			
Quel est le sérotype : A _____ B _____ C _____ Autre _____ Pas de sérotypage _____			
Formulaire rempli par :			
Nom : _____ Signature : _____ Date : _____			
Formulaire contrôlé par :			
Nom du responsable: _____ Signature : _____ Date : _____			

Annexe 3 :

Méthodes microbiologiques d'identification de *H. influenzae* dans le liquide céphalorachidien

Remarque : Cette annexe s'appuie sur le "Manual for the National Surveillance of Antimicrobial Resistance of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* : Epidemiological and Microbiological Methods", Field Test Version, August 1994, WHO/CDC.

On suppose dans cette annexe, que le service compte au moins un microbiologiste ayant une formation classique, connaissant bien les techniques de stérilisation, notamment la stérilisation des anses et des becs des récipients à la flamme, l'utilisation d'un autoclave et des rubans de contrôle de stérilisation ou d'indicateurs équivalents tels que des bactéries sporulées, et l'emploi de filtres pour stériliser les liquides thermolabiles. Le microbiologiste doit également savoir utiliser un microscope pour l'examen des colorations de Gram, examiner les colonies sur gélose et se servir d'un pH-mètre pour déterminer le pH des échantillons.

Le microbiologiste doit savoir comment on sélectionne les colonies afin d'obtenir des cultures pures de *H. influenzae*. Il doit également connaître les techniques d'entretien, de conservation et de transport des cultures bactériennes pures. Enfin, il doit parfaitement connaître les mesures de sécurité, et notamment l'élimination des matériels utilisés et non utilisés.

Les microbiologistes participant au projet doivent tous lire soigneusement cette partie du protocole. On pourra connaître le nombre prévu d'échantillons à tester, en s'adressant au coordinateur de la surveillance.

A. Prélèvements

Le prélèvement constitue une étape importante de l'identification des agents bactériens responsables de la méningite. Lorsque c'est possible, il est préférable de réaliser le prélèvement avant la mise en route de l'antibiothérapie. Les prélèvements doivent être traités le plus tôt possible par le laboratoire. S'ils ne peuvent être mis immédiatement en culture, se reporter à la section F de cette annexe, où l'on trouvera des instructions concernant le transport du matériel clinique.

La ponction lombaire, qui permet de recueillir le liquide céphalorachidien (LCR), est une technique invasive qui doit être pratiquée exclusivement en milieu hospitalier, par du personnel expérimenté. Lorsqu'il est prélevé et traité correctement, le LCR est une excellente source de *H. influenzae*. La ponction lombaire doit être pratiquée en vue du diagnostic et pas seulement de la surveillance. Onensemencera directement une gélose chocolat avec le LCR (sans le diluer dans un bouillon comme pour les hémocultures).

B. Transport du matériel biologique

H. influenzae est un germe exigeant et fragile, plus facile à isoler si le prélèvement de LCR est mis en culture immédiatement.

C. Conditions d'incubation

Les boîtes ensemencées avec le LCR seront incubées à 35-37°C, dans un incubateur sous atmosphère contenant 5-10 % de CO₂ ou dans une cloche à bougie.

D. Ensemencement du milieu de culture primaire

Une partie du LCR sert à ensemencer le milieu de culture primaire. Pour *H. influenzae*, on utilisera une gélose chocolat (complémentée de préférence en facteurs X et V). Le LCR est ensemencé en stries ou étalé sur la gélose au moyen d'une anse afin d'obtenir des colonies isolées. Les boîtes sont mises en culture dans un incubateur sous 5-10 % de CO₂ ou une cloche à bougie.

E. Repiquage et identification

Comme le but principal de ce protocole est d'aider à l'identification des méningites à *H. influenzae*, les méthodes décrites ne sont pas conçues pour permettre une identification optimale des autres germes susceptibles d'avoir une importance clinique. Pour connaître les méthodes d'identification de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* et d'autres germes, il faut se reporter aux manuels de microbiologie clinique, le "Manual on Clinical Microbiology" (de l'American Society for Microbiology) par exemple, qui indiqueront les méthodes d'identification de ces germes. Les colorations de Gram sur les colonies peuvent aider à l'identification des germes lorsqu'on observe en particulier, des réactions atypiques ou aberrantes avec les tests d'identification de *H. influenzae*. En effet, *H. influenzae* se présente sous forme de bâtonnets Gram négatifs répartis au hasard. Pour connaître l'aspect des autres bactéries à la coloration de Gram, on consultera d'autres manuels.

Concernant l'isolement de *Streptococcus pneumoniae*, se reporter au document CDC/OMS déjà cité que l'on peut obtenir en s'adressant au Programme de Lutte contre les Infections Respiratoires Aiguës, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27 (Suisse).

Concernant l'isolement de *Neisseria meningitidis*, on se reportera au document OMS "Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque, Guide pratique OMS", que l'on peut obtenir à l'adresse suivante : Editions Fondation Marcel Mérieux, 17 rue Bourgelat, Boîte postale 2021, 69227 Lyon (France).

E.1 Identification des colonies

Sur gélose chocolat, *H. influenzae* se présente sous forme de grosses colonies, plates, opaques, incolores à gris. Il n'y a ni hémolyse ni changement de coloration apparents du milieu de culture. Les souches capsulées donnent des colonies plus mucoïdes que les souches non capsulées, qui se présentent sous forme de colonies compactes et grisâtres.

E.2 Identification de *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae est un germe exigeant, qui a besoin pour pousser d'un milieu contenant de l'hémine (facteur X) et de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD, facteur V). Le germe pousse sur gélose chocolat, car le NAD (facteur V) est libéré par chauffage au cours de la préparation de la gélose chocolat. L'hémine est obtenue à partir des globules rouges hémolysés aussi bien que des globules rouges non hémolysés. Le besoin en facteurs X et V est un élément d'identification de *H. influenzae*. Une colonie isolée prélevée sur le milieu d'isolement primaire est repiquée sur gélose chocolat. Après une nuit d'incubation, on prépare une suspension épaisse dans un bouillon approprié - trypticase soja, infusion de coeur, eau peptonée. En préparant le bouillon, on veillera à ne pas le contaminer par du milieu : la présence de gélose, même en quantité extrêmement faible, perturberait le résultat des tests et conduirait à une erreur d'identification du germe.

La suspension est utilisée pour ensemercer une boîte de gélose (trypticase soja ou infusion de coeur). Une grande anse de la suspension (2 ou 3 anses si celle-ci est petite) est ensemercée en stries sur la moitié de la boîte et, après séchage de l'inoculum, on dispose des bandelettes ou des disques contenant les facteurs X, V et XV sur la zone ensemercée. *H. influenzae* ne pousse qu'autour des disques contenant à la fois les facteurs X et V.

La gélose chocolat sert également à préparer un échantillon qui sera congelé et permettra le stockage définitif de la souche (voir section F de cette annexe concernant la conservation). Si la souche d'*Haemophilus* doit être transportée, on fera en même temps un ensemencement sur gélose chocolat inclinée à partir de la gélose en boîte.

F. Conservation et transport de *H. influenzae*

Pour confirmer l'identification des germes isolés pendant ces études et tester leur sensibilité aux antimicrobiens, il est parfois nécessaire de conserver et d'envoyer les souches à des laboratoires de référence nationaux et/ou de l'OMS. *H. influenzae* est une bactérie fragile, qui demande beaucoup de précautions pour être conservée et transportée.

Pour une conservation de courte durée (une semaine maximum), la viabilité est optimale si *H. influenzae* est ensemercé sur gélose chocolat inclinée (dans des tubes à bouchon vissé), incubé une nuit à 35°C, puis maintenu à 4°C. La survie de *H. influenzae* en bouillon est mauvaise, elle est d'une durée de 3 à 5 jours sur gélose primaire en boîte. La conservation en vue de l'envoi aux laboratoires de référence doit donc être une composante essentielle de ce programme.

La lyophilisation et la congélation sont mieux adaptées à la conservation de longue durée. On trouvera des instructions détaillées sur ces deux méthodes dans le manuel CDC/OMS déjà cité. Les cultures à l'état congelé doivent être remises en culture, ensemercées sur gélose chocolat inclinée dans des tubes à bouchon vissé, incubées une nuit, puis emballées en vue du transport.

Correctement emballées, les cultures peuvent être transportées sans avoir besoin d'être réfrigérées. L'emballage doit être conforme à la réglementation indiquée dans le "Manuel de sécurité biologique en laboratoire", publié par l'OMS (Genève, 1987).

En résumé, les flacons ou les tubes contenant les cultures doivent être enfermés hermétiquement dans un container métallique, lui-même enfermé dans un emballage extérieur pourvu d'une étiquette portant l'adresse et d'une étiquette de mise en garde contre la présence de germes infectieux. Le tube ou le flacon de culture doit être emballé dans une quantité de matériel absorbant suffisante pour absorber la totalité du contenu au cas où il serait brisé. La quantité de matériel par paquet envoyé, ne doit pas dépasser 50 ml. Les cultures lyophilisées sont transportées en toute sécurité si le flacon est bien emballé.

Annexe 4 :

Méthode d'estimation de l'importance locale des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses

Dans la plupart des pays, les infections aiguës des voies respiratoires basses sont une cause majeure de mortalité infantile.¹ D'après l'OMS, plus de 30 % de l'ensemble des décès d'enfants de moins de 5 ans sont dus aux infections aiguës des voies respiratoires basses dans les pays ou les régions en développement (3,7 millions de décès par an).² La proportion des décès imputables à ces affections dans un pays donné tend à être plus élevée que la moyenne mondiale pour les pays qui ont des taux de mortalité infantile élevés et plus faible que cette même moyenne pour les pays qui ont des taux de mortalité infantile faibles.³

Les Centres pour la Surveillance et la lutte contre les Maladies (Centers for Disease Control and Prevention) d'Atlanta (GA, Etats-Unis d'Amérique) et le Programme OMS de Lutte contre les Infections respiratoires aiguës (Genève, Suisse) ont récemment réexaminé l'épidémiologie et l'étiologie des pneumopathies dans les pays en développement. Ils sont parvenus à la conclusion que sur l'ensemble des décès d'enfants de moins de 5 ans par infection aiguë des voies respiratoires basses estimé à 3,7 millions dans les pays en développement, 342 000 (soit 9 %) sont dus au Hib.² Cette estimation du nombre de décès par infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses est environ dix fois plus élevée que le nombre estimé de décès par méningite à Hib chez l'enfant de moins de 5 ans dans les pays en développement (J Schillinger, CDC, communication personnelle, 1995).

Lorsqu'on interprète cette estimation mondiale de l'importance des pneumopathies à Hib, il est important de ne pas oublier que la proportion de pneumopathies bactériennes dues au Hib varie considérablement d'une zone géographique à l'autre. Par conséquent, on peut se demander si les estimations mondiales concernant l'importance des pneumopathies à Hib sont appropriées pour une zone de surveillance donnée. Pour bien faire, il faudrait utiliser les données recueillies à partir d'études bien conçues sur les agents étiologiques des pneumopathies chez l'enfant de moins de 5 ans dans cette zone de surveillance. Cependant, le diagnostic étiologique des pneumopathies est difficile à poser et il n'est pas réaliste d'espérer disposer de ces informations dans chacun des sites. Lorsqu'elles existent, ces données seront utilisées pour estimer l'importance des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses.

¹ Greenwood B. Epidemiology of acute lower respiratory tract infections, especially those due to *Haemophilus influenzae* type b, in The Gambia, West Africa. *J Infect Dis.* 1992; 165(Suppl 1):S26-8.

² Schwartz B, Gove S, Lipman H, Lob-Levy G. The etiology of acute lower respiratory tract infections among young children in developing countries. *Pediatr Infect Dis. J.* (sous presse).

³ Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Statistics Q*, 1992; 45:180-91.

On peut calculer l'importance de la pneumopathie à Hib dans une zone de surveillance d'après les estimations de l'OMS sur l'importance mondiale des pneumopathies à Hib, les données de mortalité des ministères de la santé et les données de la surveillance de la méningite à Hib, comme l'indique la feuille de calcul ci-jointe. La première étape de l'estimation consiste à déterminer l'importance nationale de la mortalité infantile par infection aiguë des voies respiratoires basses. Dans de nombreux pays, on trouvera ces données dans les enquêtes de mortalité ou les registres de décès. Lorsque ces données n'existent pas, la mortalité par infection aiguë des voies respiratoires basses peut être estimée à partir du taux de mortalité global, toutes causes confondues, chez l'enfant de moins de 5 ans. La part de mortalité imputable aux infections aiguës des voies respiratoires basses augmente avec le taux global de mortalité infantile³, comme l'indique le coefficient correcteur donné à l'étape 1 de la feuille de calcul.

On peut estimer l'importance globale de la mortalité par pneumopathie à Hib, en multipliant le nombre estimatif de décès dus aux infections aiguës des voies respiratoires basses, par la proportion de ces infections susceptibles d'être provoquées par le Hib (9 %) (étape 2 de la feuille de calcul). Pour calculer le nombre de cas de pneumopathie à Hib à partir du nombre de décès, il faut diviser le nombre estimatif de décès dus aux infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses par 6 %, le taux de létalité des pneumopathies à Hib estimé par CDC/OMS (étape 3 de la feuille de calcul).

Calcul des taux annuels de mortalité et de morbidité par infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses

Etape 1. Estimation du nombre de décès par infection aiguë des voies respiratoires basses pour 1000 enfants de moins de 5 ans

Origine des données : Utiliser, si elles existent, les statistiques du programme national de lutte contre les infections aiguës des voies respiratoires basses. Si les données concernant la mortalité par infection aiguë des voies respiratoires basses n'existent pas, estimer le taux de mortalité des infections aiguës des voies respiratoires basses en multipliant le taux de mortalité globale toutes causes confondues pour 1000 enfants de moins de 5 ans, par le coefficient correcteur approprié (d'après Garenne et al. 1992) :

Décès toutes causes confondues pour 1000 enfants <5 ans	Coefficient correcteur
>75	0,25
25-75	0,20
10-24	0,15
<10	0,10

Nombre estimatif de décès par infection aiguë des voies respiratoires basses pour 1000 enfants <5 ans = $\frac{\text{mortalité toutes causes}}{\text{coefficient correcteur}} = (A)$

Etape 2. Estimation du nombre de décès par infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 1000 enfants de moins de 5 ans

Origine des données : D'après une mise au point de l'OMS sur l'étiologie des décès par infection aiguë des voies respiratoires basses dans les pays en développement, en moyenne, 9 % des décès imputables à ces pathologies sont dues au Hib (Schwartz et al., sous presse). Pour calculer le nombre estimatif de décès dus aux infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses, multiplier le taux de mortalité des infections aiguës des voies respiratoires basses pour 1000 enfants <5 ans (soit (A)) par 0,09.

Nombre estimatif de décès dus aux infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses pour 1000 enfants <5 ans = $(A) \times 0,09 = (B)$

Etape 3. Estimation du nombre de cas d'infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 1000 enfants de moins de 5 ans

Origine des données : D'après une mise au point de l'OMS sur l'étiologie des décès par infection aiguë des voies respiratoires basses dans les pays en développement, le taux de létalité des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses est en moyenne de 6 % (Schwartz et al., sous presse). Pour obtenir le taux d'incidence des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses, diviser le taux obtenu ci-dessus (taux de mortalité des infections aiguës à Hib des voies respiratoires basses (soit (B)) par 0,06.

Nombre estimatif de cas d'infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 1000 enfants <5 ans = $(B)/0,06 = (C)$

Etape 4. Estimation du taux annuel de cas d'infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 100 000 enfants de moins de 5 ans

Pour pouvoir comparer le taux annuel de cas d'infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 1000 enfants aux taux pour 100 000 enfants de moins de 5 ans calculés pour la méningite, multiplier le taux (C) par 100.

Nombre estimatif de cas d'infection aiguë à Hib des voies respiratoires basses pour 100 000 enfants <5 ans = $(C) \times 100 = (D)$